

PROSJEKTOPPGAVE – MEDISIN UiO

Cellefordelingsmønstre i spinalvæsken hos MS-pasienter



ANETTE NORMANN OG TRINE G. EVENSEN

FORORD

Etter å ha hatt nevrologi på 7. semester fattet vi interesse for faget og ønsket å skrive en oppgave innen dette feltet. Vi tok kontakt med dr Tormod Fladby på Ahus for å høre om det var noen interessante prosjekter som vi kunne ta del i. Våre interesseområder var da multippel sklerose, nevroboreliose og polynevropati. Dr Fladby inviterte oss til å ta del i et prosjekt hvor man bl.a. så på celled fordelingsmønstre i spinalvæsken hos MS og demenspasienter.

Vi vurderte en stund å skrive om celled fordelingsmønstre både hos MS-pasientene og demenspasientene. Klassifiseringsarbeid ble derfor gjort på begge disse pasientgruppene. Underveis så vi at dette ville bli for omfattende for denne type oppgave. Etter at klassifiseringsarbeidet var gjort på begge grupper, bestemte vi oss derfor for kun å ta for oss MS-gruppen.

Vi vil takke dr Fladby, Hanne Mali Møllergård (MSc) og Lisbeth Johnsen (Cand. Scient) for god hjelp og oppfølging under arbeidet med denne oppgaven.

ABSTRACT

MS is a chronic, inflammatory, demyelinating disease of the CNS. It is characterized by lesions in especially the white areas of the brain. The immunological mechanisms are not completely recognized.

Intrathecal IgG-production is associated with MS. Oligoclonal IgG-bands are pathological findings, but it is not specific. T-cells are also very involved in the pathogenesis of MS, but their role is not completely understood. Macrophages are the dominating cell type in active MS-lesions.

We used CSF samples from 51 patients under investigation for MS. The samples were already processed with flow-cytometria for cell counts. We studied the patients' journals and classified them into MS and controls. The patients were classified according to type of MS and EDSS.

The most interesting findings were in the monocyte population. Percentage of highly activated monocytes were lower in MS-patients than in controls, and the low activated monocytes were higher in MS-patients than in controls, though these findings were not statistically significant.

We found nearly significant findings for the index highly activated monocytes/low activated monocytes. Future studies should aim to see if this index, combined with the numbers of each variable in the index might be used as a diagnostic marker.

INNHALDSFORTEGNELSE

1 INNLEDNING	6
1.1 Problemstilling	6
1.2 MS	6
1.2.1 Generelt	6
1.2.2 Epidemiologi	6
1.2.3 Etiologi	6
1.2.4 Patogenese	6
1.2.5 Klinikk – symptomer og funn	7
1.2.6 Typer MS	7
1.2.7 McDonald og EDSS	8
1.2.8 Behandling	9
1.2.9 Prognose	9
1.3 MS og cellefordeling	10
1.3.1 B-celler	10
1.3.2 T-celler	10
1.3.3 Makrofager/monocytyter	10
2 METODE	11
2.1 Materiale	11
2.2 Metode	11
2.2.1 Flowcytometri	11
2.2.2 Flowcytometri for dette materialet	11
2.2.3 Klassifisering	12
2.2.4 Statistikk	12
2.2.5 Litteratur	13
2.2.6 Feilkilder	13
3 RESULTATER	14
3.1 McDonald	14
3.2 EDSS	14
3.3 Utført statistikk i SPSS	14
3.3.1 Cellefordeling CSF alle MS-typer vs kontroller	14
3.3.2 Diagram	16
3.3.3 Cellefordeling CSF RR-MS vs kontroller	16
3.3.4 EDSS-score vs cellepopulasjoner	18
3.3.5 Monocyt-indeks	19
3.3.6 Cellefordeling PB MS vs kontroller	20
4 DISKUSJON	22
4.1 Immuncellenes rolle i CNS ved MS	22
4.2 Cellefraksjonenes rolle intratekalt	22
4.2.1 B-celler	22
4.2.2 T-celler	22
4.2.3 Monocytyter/makrofager	22

4.3 Signifikante funn i CSF alle MS-pasienter	22
4.3.1 T-celler	22
4.3.2 Monocyttar	23
4.3.3 Høyaktiverte vs lavaktiverte monocyttar	23
4.3.4 Monocyttar og dendrittiske celler	23
4.3.5 B-celler	24
4.4 Signifikante funn i CSF RRMS-pasienter	24
4.5 EDSS-score og cellepopulasjonar	24
4.6 Perifert blod	25
 5 KONKLUSJON	 26
 6 REFERANSER	 27
 7 VEDLEGG	 29

1 INNLEDNING

1.1 PROBLEMSTILLING

Oppgaven omhandler cellefordelingsmønstre i spinalvæsken hos pasienter diagnostisert med MS. Vi ønsket å se på om det var noen forskjeller i ulike celletall mellom MS-gruppen og kontrollgruppen, samt om vi kunne finne sammenhenger mellom ulike celletall og klassifiseringskriterier for funksjon (EDSS) hos disse pasientene.

I tillegg ønsket vi å se på noe litteratur som tidligere er utgitt om dette temaet, både for å få en oversikt over kunnskapen som finnes om temaet og for å sammenligne andres funn med våre egne.

1.2 MS

MS er en kronisk, inflammatorisk og demyeliniserende sykdom som rammer sentralnervesystemet.

1.2.2 Epidemiologi

Om lag 5000 nordmenn har fått diagnosen MS [1]. Forekomsten av sykdommen varierer med geografi og rase. Man ser en høyere forekomst hos den hvite befolkning i tempererte regioner. Befolkningsgrupper som har lav prevalens er samer og nordamerikanske indianere [2].

MS rammer særlig unge voksne. Symptomdebut sees oftest i aldersgruppen 20-45 år. Kvinner rammes nesten dobbelt så hyppig som menn.

1.2.3 Etiologi

Ingen har ennå kartlagt årsaken til MS. Forskning gjort på MS kan tyde på at sykdommen skyldes en kombinasjon av en arvelig disposisjon og eksponering for en eller flere miljøfaktorer, infeksjoner eller andre agens [2].

1.2.4 Patologi

MS er karakterisert ved at det dannes plakk i den hvite og den grå substansen i CNS. Plakkene varierer i størrelse og lokalisasjon. Predileksjonssteder er nervus opticus, subkortikale og periventrikulære områder i cerebrum, hjernestammen, cerebellum og ryggmargen. Plakkene viser stor grad av heterogenitet med varierende grad av immunglobulin, komplementavleiring, demyelinisering og destruksjon av oligodendroglia [3].

Hva som er den immunologiske mekanismen bak plakkdannelsen er ennå ikke kjent, og det er flere hypoteser. En av teoriene går ut på at autoreaktive T-lymfocytter aktiveres i den perifere sirkulasjonen og vandrer over blod-hjernebarrieren. I CNS danner T-lymfocytene en påfølgende lokal inflammatorisk prosess sammen med makrofagene. Immunologisk aktive substanser frisettes og dette er med på å opprettholde inflammasjonen. Myelinskaden oppstår via flere mekanismer, bl.a gjennom fagocytose, komplementaktivering, direkte toksisk effekt av immunoaktive substanser og ved at CD8⁺ T-lymfocytter angriper

oligodendrocytten. Myelin degraderingsprodukter kan sees i makrofager og er et av kjennetegnene på aktive lesjoner [3].

Ny forskning foreslår at også B-lymfocytene spiller en viktig rolle i patogenesen ved MS. Det har lenge vært kjent at B-lymfocytene produserer IgG intratekalt og danner oligoklonale bånd. En teori går ut på at T-hjelpecellene gjenkjenner deler av IgG molekylerne og at dette igjen vil stimulere B cellene til å produsere mer IgG, slik at man kommer inn i en immunologisk ”ond sirkel” [4].

Forskning har også funnet at B-cellene i CSF produserer antistoffer som er myelinspesifikke og at om lag halvparten av MS pasientene har IgG-lagre i de demyeliniserende plakkene [5]. At behandling med rituximab (monoklonalt antistoff mot CD20 – som primært finnes på B-celler) har vist seg å være effektivt hos MS pasienter understøtter også teorien om at B-lymfocytter spiller inn i patogenesen [6].

1.2.5 Klinikk og symptomer

Det er et meget sammensatt og variert symptombylle ved MS. Dette skyldes at demyeliniseringen kan opptre på ulike områder i CNS. Pasientene vil dermed få symptomer avhengig av hvilke steder av CNS som rammes. Vanlige symptomer er imidlertid synsforstyrrelser med nedsatt visus og/eller dobbeltsyn, sensibilitetsforstyrrelser, motoriske utfall (eks pareser), imperiøs vannlatingstrang og tarmfunksjonsforstyrrelser. Man kan også ha symptomer fra hjernestammen og cerebellum. Fatigue kan opptre hos opptil 80 % av pasientene [3].

Den vanligste formen for MS er relapserende remitterende. Denne typen er kjennetegnet ved at man har anfall som kan oppstå i løpet av timer til dager. Symptomene kan persistere fra noen dager og opptil en måned. Anfallet vil så gå i remisjon og pasientene vil ha symptomfrie perioder av ulike lengder.

Ved en nevrologisk undersøkelse av en MS pasient vil funnene variere avhengig av hvilken del av sentralnervesystemet som er affisert. Typiske nevrologiske utfall er sentrale lammelser, temporeduksjon, koordinasjonsforstyrrelser og sensibilitetsutfall. Hyperrefleksi og inverterte plantarreflekser kan være tilstede. L’hermittes fenomen er et vanlig funn. Ved hjernenerveundersøkelse kan man få utfall som nystagmus, dysartri og ataksi.

1.2.6 Typer av MS

MS deles vanligvis inn i 4 hovedtyper [7]:

1) Relapserende remitterende (RR) MS

Hos ca 80% av MS-pasientene starter sykdommen med et anfallsvis forløp, der kraftige anfall av et par dagers varighet følges av perioder på 4-8 uker med få eller ingen symptomer. Dette kalles et relapserende remitterende forløp. De fleste med denne typen MS vil for hvert anfall bli gradvis mer preget av sykdommen, også mellom anfallene. Etter en tid vil de fleste gå over i en sekundær progressiv form.

2) Primær progressiv (PP) MS

15-20% av MS-pasientene, særlig de som er eldst ved sykdomsdebut, har ikke det karakteristiske anfallsvis forløpet. Disse utvikler langsomt og gradvis økte plager, uten å ha symptomfrie perioder. Dette kalles et progressivt sykdomsforløp.

3) Sekundær progressiv (SP) MS

De fleste pasienter som i begynnelsen av sykdommen hadde et relapserende remitterende forløp vil etter hvert utvikle sekundær progressiv MS. I likhet med primær progressiv MS vil den sekundære formen være preget av gradvis forverring uten symptomfrie perioder.

4) Progressiv-relapserende (PR) MS

Dette er en svært sjelden form for MS, der pasienten fra begynnelsen av har et progressivt forløp med gradvis forverring. På toppen av denne gradvise forverringen kommer det kraftige anfall, men pasienten blir ikke helt bra i periodene mellom anfallene.

1.2.7 McDonald og EDSS

McDonald-kriteriene er en internasjonal standardisering for å stille diagnosen MS.

McDonald kriterier (revidert 2005) [2]

Kliniske angrep	Objektive lesjoner	Tilleggskrav for å kunne stille diagnosen
To eller flere	To eller flere	Ingen; kliniske holdepunkter er tilstrekkelig
To eller flere	En	Disseminasjon i rom ved MR <i>eller</i> to eller flere MR-påviste lesjoner forenlig med MS + intratekal IgG-syntese i spinalvæske <i>eller</i> vent på ytterligere kliniske angrep som peker mot annet sted i CNS
Ett	To eller flere	Disseminasjon i <i>tid</i> ved MR <i>eller</i> andre kliniske angrep
Ett – monosymptomatisk	En	Disseminasjon i <i>rom</i> ved MR <i>eller</i> to eller flere MR-påviste lesjoner forenlig med MS + intratekal IgG-syntese i spinalvæske og Disseminasjon i <i>tid</i> ved MR <i>eller</i> andre kliniske angrep
Gradvis neurologisk progresjon som peker mot multipel sklerose		Et år med sykdomsprogresjon (retrospektivt eller prospektivt vurdert) og to av de følgende faktorer: a) Positiv MR av hjernen (ni T2 lesjoner eller fire eller flere T2 lesjoner med positiv VER) b) Positiv MR av ryggmargen (to fokale lesjoner) c) Intratekal IgG-syntese i spinalvæske

EDSS Expanded disability status scale

EDSS er en nevrologisk vurderingskala hos MS-pasienter for å bedømme deres funksjonsnivå. Vurderingen gjøres ut fra en nevrologisk undersøkelse hvor man bedømmer utfallet på følgende 8 områder i CNS.

- Mentale funksjoner
- Visuelle funksjoner
- Hjernestammefunksjoner (øyebevegelser, svelgeevne, ansiktssensorikk)
- Sensoriske funksjoner
- Pyramidebanefunksjoner (viljestyrte bevegelser)
- Cerebellare funksjoner (koordinasjon av bevegelse og balanse)
- Urinblære- og tarmfunksjoner

Ut fra grad av svekkelse innenfor de forskjellige områdene får man et poeng. 0 betyr funksjonsfrisk, mens 5 eller 6 representerer en total funksjonssvekkelse. Poengene innenfor de forskjellige områdene kan plasseres inn i en EDSS skala. Skalaen går fra 0 til 10 hvor 0 tilsvarer en funksjonsfrisk pasient uten nevrologisk utfall og 10 tilsvarer død [8], [9].

Se vedlegg 1 og 2.

1.2.8 Behandling

Det finnes ingen kausal behandling for sykdommen. Målet med behandling er å bedre livskvalitet, samt redusere varighet og hyppighet av sykdomsatakker. I tillegg spesifikk behandling av svimmelhet, blærefunksjonsforstyrrelser, obstipasjon, nevrogen smerte og spastisitet.

Medikamentelle behandlingsformer er betainterferoner og glatirameracetat. Disse kan redusere anfallsraten og forebygge progresjon. Natalizumab er aktuelt dersom betainterferoner ikke har effekt ved anfall, eller ved rask sykdomsutvikling. Denne kan også gi klinisk remisjon og tilbakegang av radiologiske funn. Humant Ig kan også være et alternativ dersom de ovenstående ikke har effekt. [2] Anfall kan forsøkes behandles med kortikosteroider. [3]

Det er vanlig med enkle råd om fysisk aktivitet, tilpasset funksjonsnivå og nok hvile. [3]

Når det gjelder primær progressiv type er det få behandlinger som foreløpig er vist i forsøk å hjelpe disse pasientene [2].

1.2.9 Prognose

Pasientene med relapserende-remitterende type har best prognose. Dette har også sammenheng med at disse pasientene har best utbytte av de tilgjengelige behandlingsformene. Ca 80% av disse utvikler innen 20 år sekundær progressiv type. 20% har et mildt forløp med normal livslengde.

Ca 15% debuterer med primær progressiv type, av disse har ca 60% funksjonshemninger av varierende grad innen 20 år. Ca 20% er døde og 20% har liten eller ingen funksjonshemning i løpet av samme tidsperiode [2].

Leveutsiktene varierer sterkt, men median overlevelse er ifølge større kliniske studier 30-40 år etter sykdomsdebut. Ca 55-75 % dør av MS-relaterte tilstander, oftest av infeksjoner. [3]

1.3 MS OG CELLER I CSF

En økning av inflammatoriske celler i CSF er karakteristisk for MS.

Hos MS-pasienter finner man typisk unormale nivåer av IgG og inflammatoriske celler i CSF, særlig gjelder dette CD4⁺ T-celler og makrofager/monocytter. Både IgG og T-cellene er en del av patogenesen ved MS, men den direkte rollen er ennå ikke helt klarlagt.

Det er vist individuell heterogenitet av cytologiske profiler i CSF, avhengig av sykdomsaktivitet. De fleste pasienter viser en dominans av T lymfocytter i CSF, mens noen også viser en predomans av B-lymfocytter og monocytter. [17]

1.3.1 B-celler

Intratekal IgG-produksjon er assosiert med MS. Oligoklonale bånd er et patologisk funn, men er ikke spesifikt. Dette vil enten reflektere økt BBB-permeabilitet og/eller en aktiv B-celleprosess i hjerneparenchymet. Parenchymet er normalt ikke en plass for B-celleresponser og antistoffproduksjon, men enkeltceller kan krysse BBB ved økt permeabilitet og produsere IgG fra CNS.

Menge et al gjennomførte PCR på CSF plasmaceller og CD19⁺ B-celler som viste at disse cellene hos MS-pasienter produserer antistoffer spesifikt mot myelin.

Pasienter med høyt B-celleantall og høy intratekal Ig-produksjon har et raskere progressivt forløp enn pasienter hvor man finner hovedsakelig monocytter. Dette kan vise at et høyt antall B-celler i CSF gir en dårligere prognose for MS-pasienter. [5]

1.3.2 T-celler

T-cellene utgjør hovedandelen av de inflammatoriske cellene i CSF. Aktiverte T-celler rekrutteres fra periferien til CNS og dermed også til CSF. Tilstedeværelse av ikke-aktiverte T-celler i CSF er også assosiert med aktiv inflammasjon eller sykdomsaktivitet.

Det er liten tvil om at T-celler spiller en viktig rolle i MS-patogenesen, men mer usikkert hva deres fullstendige rolle er [10].

1.3.3 Makrofager/monocytter

Makrofager er den dominerende celletype i aktive, demyeliniserende MS-plakk. Man kan ha et lavt antall i CSF, men cellenes produkter kan frigjøres fra plakkene og dermed detekteres i CSF.

Makrofagene spiller sannsynligvis en viktig rolle i induksjon av aksonskade via frigjøring av bl.a. frie radikaler, NO og cytokiner [11].

2 METODE

2.1 MATERIALE

Spinalvæskeprøver ble samlet fra 51 pasienter som var under utredning for MS fra september 2007 til juli 2008. Da vi startet dette prosjektet var prøvene allerede blitt behandlet og kjørt på flowcytometri-maskin for utregning av mengder av ulike leukocytter; B-celler, T-celler, Tcytotoksiske, Thjelpeceller, Thelptox (CD4+/CD8+) totale monocytt, høyaktiverte monocytt, lavaktiverte monocytt, granulocytter og totale leukocytter.

Tilgjengelig for oss var pasientlister med beskrivelse av foreløpig diagnose samt celletall i CSF og PB (perifert blod). I tillegg var det laget SPSS-filer hvor celletallene var plottet inn.

2.2 METODE

2.2.1 Flowcytometri generelt

Flowcytometri er en metode for å måle fysiske og kjemiske egenskaper ved enkeltceller. Det er mulig å vurdere både celleoverflate, cytoplasma og cellekjernen i denne metoden. Cellene merkes med fluorescerende molekyler som bindes til den komponenten i cellen man ønsker å undersøke. Flowcytometri gir mulighet for multiparameteranalyse, noe som betyr at instrumentet samtidig kan registrere flere parametere fra en og samme celle [12].

2.2.2 Flowcytometri for dette materialet

Celler fra CSF og blod ble separert i fraksjoner på grunnlag av deres uttrykk av ulike overflatemarkører. Man så på aktiverte (CD45+/CD14+/CD16+ og CD45+/CD14+/CD16++) og ikke aktiverte (CD45+/CD14+/CD16-) makrofager i tillegg til B-celler (CD45+/CD19+), T-celler (CD45+/CD3+/CD4+ og CD45+/CD3+/CD8+) og granulocytter (CD45+/SSC^{high}) fra ulike pasientgrupper.

Pasienter fikk tilsendt informasjonsskriv og samtykkeerklæring ved innkallelse til Nevrologisk poliklinikk ved Ahus. I forbindelse med utredning ble 80 -120 dråper (4-6 mL) CSF tappet fra pasienten ved lumbalpunksjon dersom samtykke var undertegnet. CSF ble holdt på is inntil merking med antistoffer. 4 mL perifert blod (PB) ble tatt ved venepunksjon i rør med antikoagulant (heparin).

Vasket CSF ble merket med alle antistoffer (se tabell neste side) i samme rør innen 1 time fra lumbalpunksjon, inkubasjon mørkt på 4°C i 30 min.

2x75 µL vasket PB ble merket med et T-cellepanel (CD45/CD3/CD4/CD8) og et monocytpanel (CD45/CD14/CD16/CD19) separat, inkubasjon mørkt på romtemperatur i 30 min. Prøvene ble kjørt på et FACSAria flowcytometer og analysert med FACSDiva software, begge fra BD.

Antistoffer (alle fra BD):

Antigen	Spesifisitet	Fluorochrome
CD45	Alle leukocytter	PerCP
CD3	T-celler	APC
CD4	T-hjelper celler	FITC
CD8	T-cytotoksiske celler	PE
CD14	Monocytter/makrofager	APC
CD16	Aktiveringsmarkør for monocytter	PE
CD19	B-celler	FITC

2.2.3 Klassifisering

Vi utførte journalstudier for å klassifisere pasientene. Vi gjennomgikk journalene i DIPS for å se hvilke som hadde blitt diagnostisert med MS, hvilke som ikke hadde fått diagnosen MS og hvilke som var usikre.

Utgangspunktet var 51 pasienter som var blitt spinalpunktet. 17 hadde i tiden etter spinalpunksjonen fått MS-diagnose. 32 var MS-utredet med negativt resultat og/eller ME-diagnose og ble innlemmet i kontrollgruppen. 2 pasienter måtte utelates pga videre utredning var påkrevd før fastsettelse av diagnose. MS-pasientene var ubehandlet på det tidspunktet prøvene ble tatt.

Av de 17 MS-pasientene var 12 kvinner og 5 menn med fødselsår 1929-1983, median 1965. 13 var av type relapserende-remitterende (RR), 3 primært progressive (PP) og 1 var foreløpig uklassifiserbar. Av de 32 kontrollene var det 16 kvinner og 16 menn med fødselsår 1948-1988, median 1968.

Alle MS-pasientene ble klassifisert iht McDonald-kriteriene og EDSS-skalaen. Denne klassifiseringen ble gjort iht journalopplysninger på det tidspunktet spinalvæskeprøven ble tatt.

2.2.4 Statistikk

Vi ønsket å gjøre enkle utregninger i statistikkprogrammet SPSS for å se på sammenhenger mellom de ulike immuncellene og MS.

Da vi hadde klassifisert alle pasientene mtp type MS, McDonald og EDSS ble disse dataene plottet inn i SPSS. Det var som nevnt på forhånd laget filer der celletall var registrert for hver enkelt pasient. Vi benyttet disse videre og laget nye variabler der vi la inn endelig diagnose, type MS, positiv eller negativ for McDonald-kriteriene og EDSS-verdier.

Vi benyttet bl.a. uavhengig t-test og div. diagrammer for å se på forskjeller i celletall mellom MS-gruppen og kontrollgruppen samt sammenhenger mellom celletall og EDSS-score.

2.2.5 Litteratur

Vi var også interessert i hva tidligere forsøk hadde vist om dette temaet. Litteratursøk ble utført i PubMed, samt at vi benyttet bøker om temaet. Vi prøvde ulike søkekriterier i PubMed for å komme fram til relevante artikler.

Søkeord:

- immunophenotypic AND multiple sclerosis
- lymphocyte subset AND multiple sclerosis
- T-lymphocyte proliferation AND demyelinating diseases

Vi fikk også anbefalt noen artikler av dr Fladby.

Av bøker brukte vi en bok vi fikk anbefalt av dr Fladby [17] samt en nevrologibok vi hadde som anbefaling fra universitetet [3].

2.2.6 Feilkilder

En rekke feilkilder er aktuelle for denne oppgaven. Når det gjelder feilkilder for arbeidet som er gjort før vi startet vår del er disse:

- Prøvene er kjørt over en ganske lang tidsperiode (longitudinelt) slik at man vanskelig kan garantere at alt er gjort helt likt.
- Selve analysene er gjort i etterkant og gjort over tid. Hvilke celler som hører til hvilken populasjon er subjektivt og bestemmes individuelt for hver pasient. Det er imidlertid kun en person som har gjort analysene. Det er derfor ikke forskjeller med tanke på hvem som analyserer.

For vår del av arbeidet er det også feilkilder.

- Enkelte journaler er noe mangelfulle og klassifiseringen kan derfor bære preg av dette. Eksempelvis kunne det være enkelte av kategoriene under EDSS-klassifiseringen det ikke er skrevet tilstrekkelig om. Vi mener likevel at journalopplysningene er såpass utfyllende at feilmarginen er liten for de pasientene vi har klassifisert.
- Man kan tenke seg at sifre kan være feiltastet i SPSS. Vi har trippelsjekket både resultater og inntasting for å unngå dette i høyest mulig grad.

3 RESULTATER

3.1 McDONALD KRITERIE

Alle MS-pasientene er positive for McDonald-kriteriene. Vi gjorde derfor ingen beregninger på bakgrunn av dette.

3.2 EDSS

EDSS-verdi varierer fra 1.0 til 7.0 med median 3.0. Kun to av pasientene har verdier høyere enn 3.5.

En verdi på 3.0 vil tilsi én moderat funksjonsforstyrrelse eller 3-4 svake [13].

3.3 UTFØRT STATISTIKK I SPSS

Vi kjørte en "Independent samples t-test" for å sammenligne de ulike celletallene i CSF mellom friske kontroller og MS-pasientene. Signifikansnivå $<0,05$.

Vi fant statistisk signifikans for forskjeller i flere ulike cellepopulasjoner.

3.3.1 Cellefordeling CSF alle MS-typer vs kontroller

For B-cellene er kontrollgruppen på 28 personer i stedet for 32 ettersom 4 av kontrollene ikke fikk målt B-cellenivå.

Gjennomsnittlig celletall i CSF:

CELLETYPE	MS	SD	KONTROLL	SD
Monocytt	7,9533	6,61428	25,6490	12,48276
Høyaktiverte monocytt	76,9567	13,34979	83,5583	9,76207
Lavaktiverte monocytt	15,5859	6,53682	13,2935	7,19973
B-celler	1,7179	0,84480	1,1991	0,45379
T-celler	79,9239	9,33879	64,8378	12,59890
T-hjelpeceller	71,7712	9,82801	45,4834	10,55315
T-cytotoksiske	20,2256	4,29200	24,2483	6,85487
T-helptox	0,8020	0,41324	1,3440	0,95098

SD= Standardavvik

Forklaring til tall i tabell:

- Monocytt, B-celler og T-celler er prosentandel av totale leukocytt.
- Høyaktiverte og lavaktiverte monocytt er prosentandel av totale monocytt.
- T-hjelpeceller, T-cytotoksiske og T-helptox er prosentandel av totale T-celler.
- T-helptox er T-celler som er dobbeltpositive (CD4+CD8+)

Se vedlegg 3

Resultater av t-test ved sammenligning mellom MS-pasienter og kontroller, like varianser ikke antatt:

CELLETYPE	P-VERDI
Monocytt	0,000
Høyaktiverte monocytt	0,084
Lavaktiverte monocytt	0,267
B-celler	0,034
T-celler	0,000
T-hjelpeceller	0,000
T-cytotoksiske	0,015
T-helptox	0,008

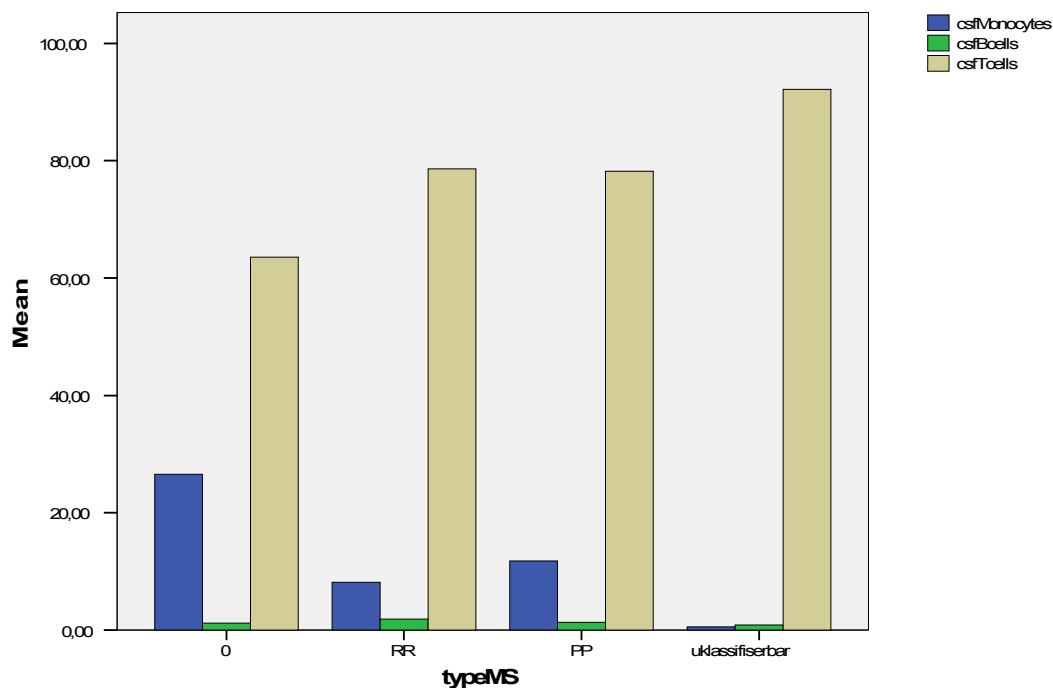
Statistisk signifikans ble oppnådd for forskjeller i celletall i flere underpopulasjoner:

- Monocytt
- B-celler
- T-celler
- T-hjelpeceller
- T-cytotoksiske
- T-helptox

I tillegg fikk vi en p-verdi for høyaktiverte monocytt på 0,084.

Se vedlegg 8

3.3.2 Diagram



Her kan vi se på de ulike cellepopulasjonene fordelt på type MS og kontroller (0). Særlig godt illustrert er at monocytt-tall er mye høyere i kontrollenes CSF, samt at T-celletall er lavere i kontrollgruppen.

3.3.3 Cellefordeling CSF RR-MS vs kontroller

Vi gjorde de samme beregningene som i 3.2.1, men vi tok bare med gruppen med RR MS:

Gjennomsnittlig celletall i CSF:

CELLETYPE	RRMS	SD	KONTROLL	SD
Monocytter	7,6355	6,80792	25,6490	12,48246
Høyaktiverte monocytter	77,7467	14,28179	83,5583	9,76207
Lavaktiverte monocytter	14,9218	7,13031	13,2935	7,19973
B-celler	1,8840	0,90143	1,1991	0,45349
T-celler	79,3807	9,83113	64,8378	12,59890
T-hjelpeceller	70,4566	10,76445	45,4834	10,55315
T-cytotoksiske	20,7400	4,66626	24,2483	7,85487
T-helptox	0,8380	0,44253	1,3440	0,95098

Se vedlegg 4

Resultater av t-test ved sammenligning mellom RRMS-pasienter og kontroller, like varianser ikke antatt:

CELLETYPE	P-VERDI
Monocytt	0,000
Høyaktiverte monocytt	0,197
Lavaktiverte monocytt	0,496
B-celler	0,026
T-celler	0,000
T-hjelpeceller	0,000
T-cytotoksiske	0,056
T-helptox	0,019

Statistisk signifikans ble oppnådd for forskjeller i celletall i flere underpopulasjoner:

- Monocytt
- B-celler
- T-celler
- T-hjelpeceller
- T-helptox

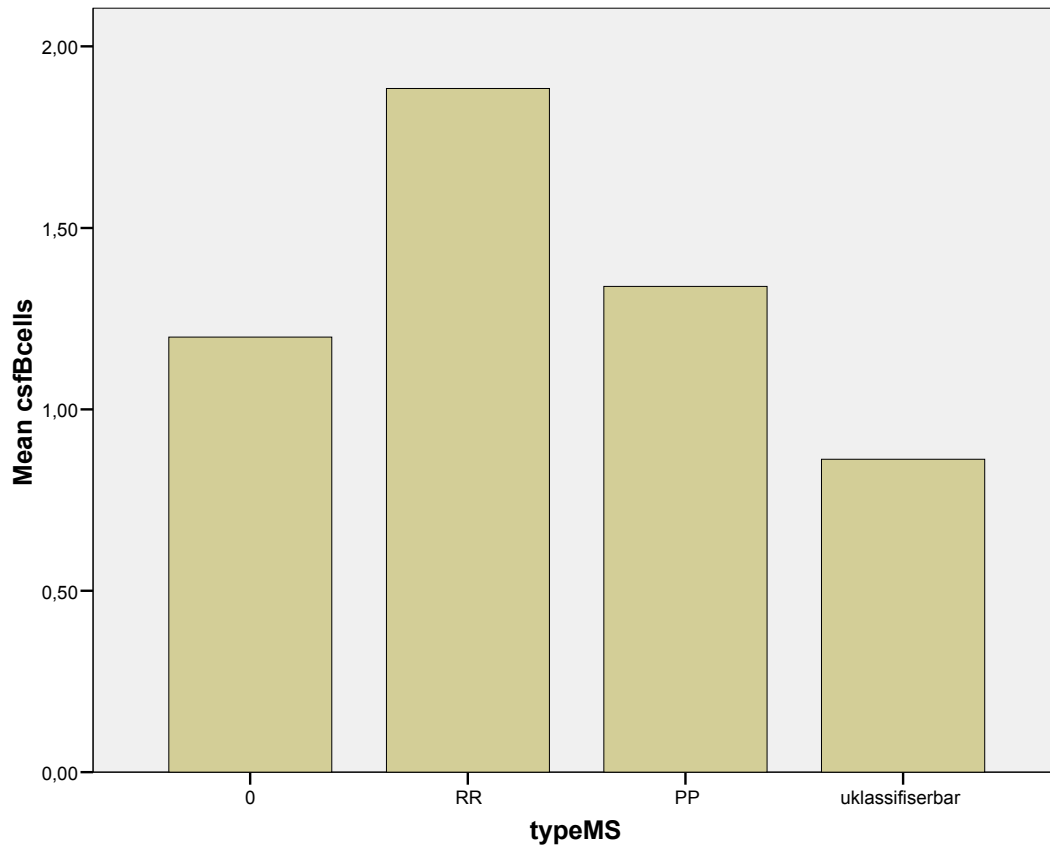
I tillegg fikk vi en p-verdi for T-cytotoksiske på 0,056.

Beregningene ble ikke gjort for primær progressiv type pga det var for få pasienter til at vi kunne oppnå noe statistisk signifikans.

Se vedlegg 9

Verdt å legge merke til er at p-verdien for B-celletallet er lavere – altså høyere statistisk signifikans – for RR-gruppen enn for MS-gruppen som helhet.

Med utgangspunkt i ovennevnte funn lagde vi et søylediagram der vi kunne se fordelingen av B-celler i CSF hos de ulike MS-gruppene sammenliknet med kontrollgruppen.



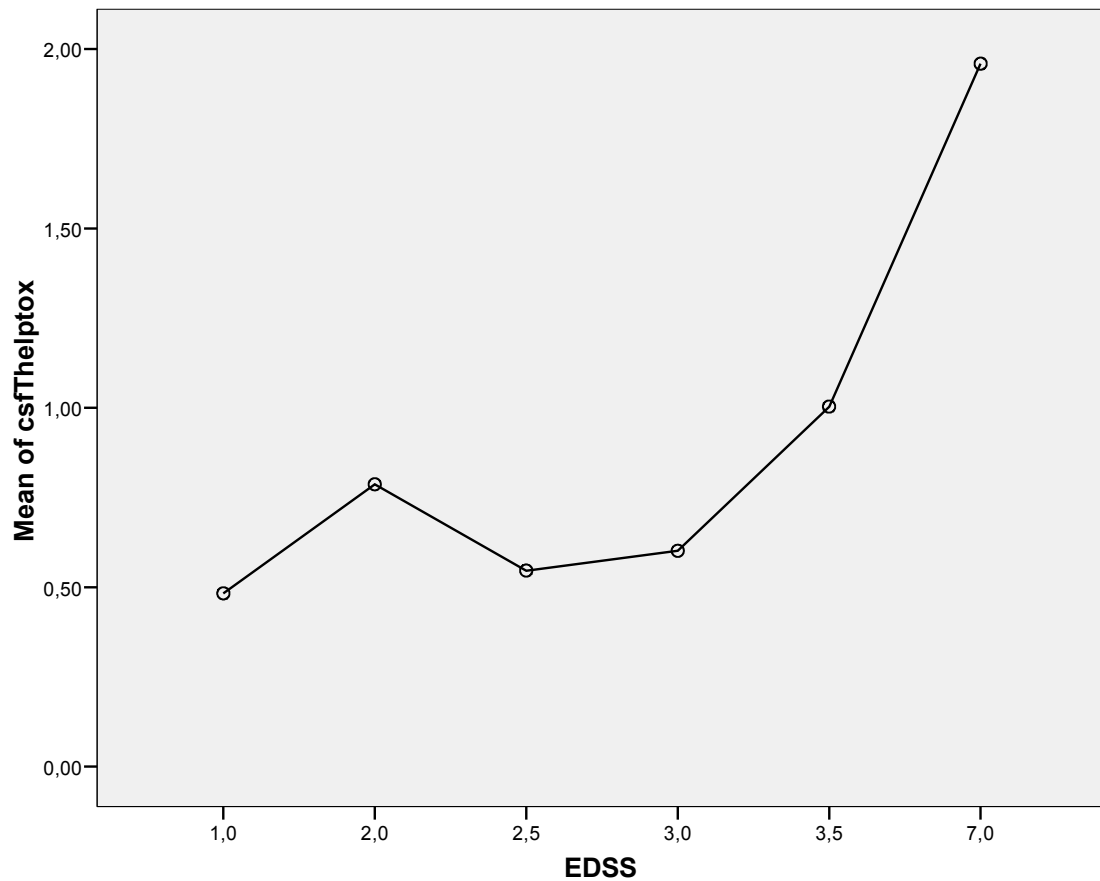
Denne fremstillingen viser at den gjennomsnittlige B-cellepopulasjonen er høyest hos pasientene med RR MS. For de med PP er ikke forskjellen så stor fra kontrollene. Vi må imidlertid huske på at denne gruppen består av svært få pasienter.

3.3.4 EDSS-score vs cellepopulasjoner

Vi lagde også grafer der vi ville se på om det var noen sammenheng mellom de ulike cellepopulasjonene og pasientenes EDSS-score.

Vi utførte en enveis ANOVA-test der vi først så på alle MS-pasientene samlet. Funnene var lite konkluderende.

Deretter så vi på kun RRMS-pasientene. Der fant vi signifikant forskjell for populasjonen av T-helptox, altså T-celler som er dobbeltpositive (CD4+CD8+)



Se vedlegg 7

3.3.5 Monocyt-indeks

Vi laget en ny variabel i SPSS med en indeks med høyaktiverte monocytt/lavaktiverte monocytt. Da fikk vi dette resultatet:

Gjennomsnittlig indeks:

INDEKS	MS-PAS	SD	KONTROLL	SD
Hact/Lact	6,2185	3,62713	8,6367	5,15922

Se vedlegg 5

Resultat av t-test, like varianser ikke antatt:

INDEKS	P-VERDI
Hact/Lact	0,063

Se vedlegg 10

3.3.6 Cellefordeling PB MS vs kontroller

Vi så også på om det kunne være noen sammenheng mellom cellefordelingsmønstrene i perifert blod (PB) hos MS-pasienter vs kontroller.

Det var ikke tatt blodprøve fra alle pasientene. Resultatene baserer seg derfor på en sammligning av PB hos 21-23 kontroller (ikke alle celletyper er målt hos alle pasienter) og 7-8 MS-pasienter.

Gjennomsnittlig celletall i PB:

CELLETYPE	MS	SD	KONTROLL	SD
Monocytt	6,4424	2,26204	5,5264	1,98347
Høyaktiverte monocytt	2,2800	1,33778	6,6711	18,49170
Lavaktiverte monocytt	11,4277	6,41217	11,8208	4,27548
Ikke-aktiverte monocytt	86,7298	7,31705	79,8664	21,44207
B-celler	3,2430	0,89052	4,3109	1,46731
T-celler	22,7001	6,23770	25,9354	6,18479
T-hjelpeceller	66,0784	6,24032	61,8527	7,93312
T-cytotoksiske (T-helptox)	27,5870	5,71630	30,9008	7,56644
Granulocytt	0,1769	0,10520	0,1811	0,15763
	59,5019	6,81465	56,6444	6,34044

Se vedlegg 6

Resultater av t-test, like varianser ikke antatt:

CELLETYPE	P-VERDI
Monocytyter	0,331
Høyaktiverte monocytyter	0,292
Lavaktiverte monocytyter	0,876
Ikke-aktiverte monocytyter	0,202
B-celler	0,024
T-celler	0,229
T-hjelpeceller	0,146
T-cytotoksiske	0,214
(T-helptox)	0,937
Granulocytyter	0,320

Her oppnådde vi kun statistisk signifikans for sammenligningen av B-cellepopulasjonen. De andre p-verdiene er såpass mye høyere enn 0,05 at det er vanskelig å si om resultatet kunne blitt noe annerledes med flere pasienter.

Se vedlegg 11

4 DISKUSJON

4.1 IMMUNCELLENES ROLLE I CNS VED MS

T-cellene har inntil nylig vært hovedfokuset når det gjelder patogenesen ved MS. Teorien er at prosessen utløses av at T-celler som reagerer med myelin og/eller at oligodendrocytter blir aktivert i perifere lymfeknuter. Aktiveringsmekanismen er ikke klarlagt, men kanskje er det en immunologisk kryssreaksjon med et infeksiøst antigen. Aktiverte T-celler stimulerer B-celler til å produsere antistoffer som er spesifikke for myelinkomponenter. Dette kan sette i gang komplementaktivering. [14]

4.2 CELLEFRAKSJONENES ROLLE INTRATEKALT

4.2.1 B-celler

B-cellene har intratekal IgG-produksjon og danner oligoklonale bånd hos MS-pasienter. Som nevnt tidligere er økt antall B-celler i CSF assosiert med mer aktiv sykdom [5].

4.2.2 T-celler

T-cellene er sannsynligvis med på å opprettholde inflammasjonen i CNS. Hestvik et al har vist at polyklonale T-hjelpeceller fra MS-pasienter gjenkjenner autologe CSF-IgG og har foreslått at IgG-idiotoper kan være T-celle-antigener i MS [15]. Disse T-cellene kan da igjen aktivere B-celler til å produsere mer IgG samt produsere cytokiner som igjen kan aktivere makrofager og cytotoksiske T-celler [4]. Slik dannes en immunologisk ”ond sirkel”.

4.2.3 Monocytt/makrofager

Det er lite monocytt i CSF hos MS-pasienter. Det er tidligere antatt at disse rekrutteres inn til CSF for å fagocyttere. Vi har ikke funnet litteratur med teorier om en intratekal rolle for monocytt ved MS.

4.3 SIGNIFIKANTE FUNN I CSF ALLE MS-PASIENTER

- Monocytt: lavere % andel av totale leukocytt hos MS-pas vs kontroller
- T-cytotoksiske: lavere % andel av totale T-celler hos MS-pas vs kontroller
- T-helptox: lavere % andel av totale T-celler hos MS-pas vs kontroller
- B-celler: høyere % andel av totale leukocytt hos MS-pas vs kontroller
- T-celler: høyere % andel av totale leukocytt hos MS-pas vs kontroller
- T-hjelpeceller: høyere % andel av totale T-celler hos MS-pas vs kontroller

Høyaktiverte monocytt: Her fant vi lavere % andel av totale monocytt hos MS-pas vs kontroller, men p-verdien var 0,084. Muligens kunne dette funnet blitt statistisk signifikant i en større pasientgruppe.

Litteratur vi har funnet om emnet tyder på at dette er pålitelige funn. Bl.a. Cepok et al hadde lignende funn for B-celler, monocytt, T-celler og T-hjelpeceller [16].

4.3.1 T-celler

De høye T-cellenivåene hos MS-pasientene (79,3807% av totale leukocytt) stemmer overens med det meste av tidligere utgitt litteratur om emnet. Det samme gjelder at andelen T-hjelpeceller (av totale T-celler) øker. En mulig forklaring er teorien om at T-hjelpecellene aktiveres av autolog IgG.

4.3.2 Monocytytter

Man vet at makrofager er den dominerende cellen inne i de demyeliniserende MS-plakkene, men man har tidligere funnet lave celletall i CSF [17]. Dette samsvarer med våre funn. Dette kan tyde på at makrofagene vandrer inn til CNS og blir der for å fagocytere. Hos MS-pasientene er det også en lavere andel av de totale monocytterne i CSF som er høyaktiverte. Dette kan muligens tyde på at flere monocytter aktiveres og rekrutteres videre inn til CNS. De aktive monocytterne er CD16-positive celler og forskjellen på lavaktiverte (CD16+) og høyaktiverte (CD16++) er at de høyaktiverte har høyere fagocytotisk aktivitet. Aktiverte monocytter utgjør ca 15 % av de totale sirkulerende monocytterne i et friskt individ [18].

4.3.3 Høyaktiverte vs lavaktiverte monocytter

Når vi ser på tallene for hhv lavaktiverte og høyaktiverte monocytter kan man ane et interessant mønster. Fraksjonen av høyaktiverte monocytter er lavere hos MS-gruppen enn hos de friske kontrollene. Fraksjonen av lavaktiverte monocytter er høyere hos MS-gruppen enn hos kontrollene. Signifikansnivået for de høyaktiverte er 0,084 og dette er såpass nærme en statistisk signifikant verdi at man kan vurdere om denne ville vært $<0,05$ hvis vi hadde hatt flere pasienter. Når de gjelder de lavaktiverte er det mye mindre signifikansnivå; 0,267. Men når man ser på tallene samlet kan dette likevel være et interessant funn.

Vi gikk videre med tallene og laget en monocytindeks, og fant da et mulig interessant funn. Vi så på indeksen høyaktiverte monocytter/lavaktiverte monocytter og sammenliknet denne indeksen for MS-pasienter og kontroller.

For indeksen Hact/Lact fikk vi en p-verdi på 0,063. Dette er kun signifikant på trendnivå, men kan vise en tendens som evt kan bekreftes med en større studie.

Om mulig kan kanskje denne indeksen vi fant for Hact/Lact monocytter i kombinasjon med høy andel lavaktiverte monocytter og lav andel høyaktiverte monocytter bli nyttige diagnostiske markører i fremtiden. Våre funn bør da reproduseres i større studier slik at p-verdien for Hact/Lact kanskje blir signifikant.

4.3.4 Monocytytter og dendritiske celler

Dendritiske celler er profesjonelle antigenpresenterende celler (APC) som er sentrale i å regulere og indusere adaptive immunresponser [19]. Studier har vist at aktive monocytter har den høyeste kapasiteten av alle leukocytytter til å promotere allogen T-celleproliferasjon. Randolph et al presenterte også nye funn som viste at CD16-ekspressjon i monocytter er assosiert med et økt potensial til å bli migratoriske dendritiske celler [18].

Karman et al stilte spørsmålet om dendritiske celler i CNS kan migrere ut til perifere lymfoide organer og der delta i initiering av immunitet mot CNS-antigener. Deres studier viste at dette kan skje. Som konsekvens av dette vil naive T-celler bli aktivert og vandre til hjernen for å angripe det presenterte antigenet [20].

CNS-antigener er funnet i dendritiske celler i cervikale lymfeknuter hos dyr med eksperimentell autoimmun encefalomyelitt, som er en dyremodell for MS [20]. Med tanke på våre funn kan man se for seg at høyaktiverte monocytter rekrutteres i større mengder inn til CNS for å fagocytere. Her omgjøres muligens en andel av disse til dendritiske celler som igjen kan emigrere til perifere lymfoide organer for å initiere immunresponser der. Man kan tenke seg at monocyttevandringen skjer som et resultat av aktivering fra B-celler med muterte

antistoffer, som også aktiverer T-celler. En evt omgjøring til dendrittiske celler og videre vandring til lymfoide organer vil dermed være med på å forsterke den immunologiske prosessen i CNS.

4.3.5 B-celler

Vi fant signifikante høyere B-celleverdier hos MS-pasientene, men det var stor variasjon innenfor MS-gruppen. B-cellene utgjør i begge grupper en liten andel av de totale lymfocytene, med gjennomsnitt 1,7179 % hos MS-gruppen og 1,1991 % hos kontrollene.

Tidligere litteratur har vist at sykdomsaktiviteten er assosiert med mengden av B-celler i CSF, jo høyere nivå dess mer aktiv sykdom [5]. Vi fant imidlertid ingen korrelasjon mellom B-celletall og EDSS-score, men variasjonen kan i stedet gjenspeile ulike sykdomsmekanismer, se senere diskusjon.

4.4 SIGNIFIKANTE FUNN I CSF RR-MS PASIENTER

- Monocytt: lavere % andel av totale leukocytter hos RRMS-pas vs kontroller
- T-helptox: lavere % andel av totale T-celler hos RRMS-pas vs kontroller
- B-celler: høyere % andel av totale leukocytter hos RRMS-pas vs kontroller
- T-celler: høyere % andel av totale leukocytter hos RRMS-pas vs kontroller
- T-hjelpeceller: høyere % andel av totale T-celler hos RRMS-pas vs kontroller

T-cytotoksiske: lavere % andel av totale leukocytter hos RRMS-pas vs kontroller, men p-verdi er 0,056. Her ville kanskje signifikansen vært sterkere dersom vi hadde hatt flere pasienter til rådighet.

Funnene her samsvarer med funnene for den generelle MS-gruppen. Det hadde muligens vært mer interessant å se på PPMS-pasientene for å vurdere deres cellepopulasjoner ettersom dette er en sjeldnere form som er forsket mindre på enn RRMS. Vi har imidlertid for få PPMS-pasienter i dette materialet til at dette lar seg gjøre.

4.5 EDSS-SCORE OG CELLEPOPULASJONER

Når vi så på sammenhengen mellom EDSS-score og de ulike cellepopulasjonene fant vi kun en statistisk signifikant sammenheng for T-helptox. Her så det ut til at dårligere fysisk funksjon (dvs. høyere EDSS-score) korrelerte med en høyere % andel T-helptox av de totale T-cellene.

I vårt materiale er det imidlertid en sterk overvekt av pasienter med EDSS-score på maks 3.5. Kun to av pasientene har verdier høyere enn 3.5. Vi kan derfor tenke oss at resultatene her kunne blitt annerledes dersom man hadde hatt et større materiale med større fordeling av EDSS-score. Ut i fra dette vil vi ikke legge for mye vekt på disse resultatene.

Cepok et al. (2001) fant ingen korrelasjon mellom EDSS-score og CSF-parametre, selv om disse brukte 60 pasienter. De fant stor variasjon i cellepopulasjonene, noen av pasientene hadde en overvekt av B-celler, andre av monocytter. Disse mønstrene var imidlertid stabile uavhengig av EDSS-score og de konkluderte dermed at dette var ikke var et uttrykk for fase av sykdom, men i stedet kan gjenspeile ulike undergrupper av patologiske mekanismer [16].

4.6 PERIFERT BLOD

Vi fant at MS-pasientene hadde en statistisk signifikant lavere andel B-celler av totale leukocytter i perifert blod enn de friske kontrollene. I tidligere litteratur er det sprikende funn.

Cepok et al (2001) sammenlignet også cellepopulasjonene i PB fra MS-pasienter og kontroller. Disse fant ingen sammenheng. De så også på om det kunne være en korrelasjon mellom cellekomposisjon i CSF og PB, men dette ble avvist. De konkluderte dermed med at distribusjonen av immunceller i CNS hos MS-pasienter ikke har noen sammenheng med immuncellekomposisjonen i PB [16]. Strauss et al. (1995) fant at høy EDSS-score korrelerte med en høyere andel T-celler og en lavere andel T-hjelpeceller [21].

Vår observasjon kan være et tilfeldig og egentlig ikke signifikant funn med tanke på at det er for få pasienter som er vurdert. I CSF er % -andelen av B-celler høyere hos MS-pasienter enn hos kontrollene, man kan derfor tenke seg at B-cellene har emigrert fra blod til CNS og er å finne igjen i CSF.

5 KONKLUSJON

Våre funn i dette forsøket samsvarer i stor grad med tidligere studier på samme tema. Dette gjelder signifikant høyere verdier av T-celler og B-celler, samt lavere verdier av monocytter hos MS-pasienter sammenlignet med kontrollene.

Vi fant imidlertid også tall vi ikke har funnet i tidligere publikasjoner. Vi fant at andelen høyaktiverte monocytter (CD16++) var lavere og lavaktiverte monocytter (CD16+) var høyere hos MS-pasienter enn hos kontrollene. Tallene var ikke helt signifikante, men vi kom nærmere signifikans når vi laget indeksen høyaktiverte monocytter/lavaktiverte monocytter. Denne må ses i sammenheng med de ovennevnte funnene.

Vi kan ikke konkludere med hvilken betydning dette funnet har helt ennå, men hvis dette funnet kan forsterkes i senere studier er det kanskje muligheter for en ny diagnostisk markør.

Forskning til nå har stort sett fokusert på B- og T-celler, men vi ser med ovennevnte resultater at monocyttenes rolle kan være viktigere enn det man tidligere har trodd. Tre punkter vil bli viktige i videre studier:

1. Man vet at det er stor andel aktiverte monocytter i MS-plakkene
2. Man vet at monocytter invaderer CNS ved inflammatoriske tilstander
3. Det ser ut til at andelen høyaktiverte monocytter i CSF er lavere hos MS-pasienter enn hos friske kontroller og andelen lavaktiverte er høyere.

Med tanke på dette bør man videre se eksperimentelt på å følge de ulike monocyttenes vandring fra CSF til CNS. Da vil man kanskje se om funnene i denne studien vil kunne få en diagnostisk betydning.

6 REFERANSER

- 1 Pasienthåndboka.no [Internet]. Norsk Helseinformatikk AS. Multippel Sklerose (MS); en oversikt. <http://www.pasienthandboka.no/default.asp?mode=document&documentid=2445> (07.08.2009)
- 2 Norsk Elektronisk Legehåndbok [Internet]. Tilstander og Sykdommer – Multippel Sklerose. <http://legehandboka.no/> (20.08.2009)
- 3 Myhr KM, Nyland H. Multippel Sklerose. I: Gjerstad L, Skjelddal DH, Helseth E. Nevrologi og Nevrokirurgi. 4 utg. Oslo: Forlaget Vett og Viten AS, 2007: side 479-490
- 4 Tidsskriftet for Norsk legeforening [Internet]. http://www.tidsskriftet.no/index.php?seks_id=1119160 (01.09.2009)
- 5 Menge et al. The role of B cells in multiple sclerosis: Experimental and clinical aspects. CML – Multiple sclerosis 2009; 1(1):1-7.
- 6 Franciotta D et al. B cells and multiple sclerosis. Lancet Neurol 2008; 7:852-58
- 7 Norsk Elektronisk Legehåndbok [Internet]. Pasientinformasjon – Multippel Sklerose – Ulike former for multippel sklerose. <http://legehandboka.no/> (07.08.2009)
- 8 Geocities.com [Internet]. The Expanded Disability Status Scale (EDSS). <http://www.geocities.com/HotSprings/3468/edss.html> (16.08.2009)
- 9 Geocities.com [Internet]. EDSS's Functional Systems. <http://www.geocities.com/hotsprings/3468/edss-fs.html> (16.08.2009)
- 10 Holmøy T. Immunopathogenesis of multiple sclerosis: concepts and controversies. Acta Neurologica Scandinavica 2007; 115(suppl 187):39-45
- 11 Hendriks JJA et al. Macrophages and neurodegeneration. Brain Research Reviews 2008; 48:185-195
- 12 Landsverk, K.S. Flowcytometri – fra basalforskning til klinikk. Bioingeniøren 2-2006 [Internet]. <http://www.nito.no/organisasjon/Bioingeniorfaglig-institutt/Bioingenioren/Bioingenioren-2006/Bioingenioren-2-2006/Flowcytometri---fra-basalforskning-til-klinikk/> (18.08.2009)
- 13 Msportalen.no [Internet]. Nevrologiske vurderingsskalaer. <http://msportalen.no/aring-forstaring-ms/aring-gi-ms-diagnose/hva-er-edss-80.htm> (28.08.2009)
- 14 Mssiden.no [Internet]. Den norske sykepleiehåndboken for MS – 1.3 MS patologi. <http://www.mssiden.no/ms-handbok/kap1-3.html> (28.08.2009)
- 15 Hestvik ALK et al. T cells from multiple sclerosis patients recognize multiple epitopes on self-IgG. Scandinavian Journal of Immunology 2007; 66:393-401

- 16 Cepok S et al. Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124:2169-2176
- 17 Wekerle H et Lassmann H. The immunology of inflammatory demyelinating disease. I: Compston A et al. *Multiple Sclerosis*. 4 utg. Churchill Livingstone Elsevier, 2006:547-555
- 18 Randolph, G.J et al. The CD16+ (FcγRIII+) subset of Human Monocytes Preferentially Becomes Migratory Dendritic Cells in a Modell Tissue Setting. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196: 517-527
- 19 Randolph, G.J et al. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annual Review of Immunology* 2008; 26: 293-316
- 20 Karman et al. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *The journal of immunology* 2004; 173:2353-2361
- 21 Strauss et al. The immune profile of multiple sclerosis: T-lymphocyte effects predominate over all other factors in cyclophosphamide-treated patients. *Journal of Neuroimmunology* 1995; 63:133-142

7 VEDLEGG

1 - EDSS

EDSS SCORE	
0	Normal Neurological Exam
1.0	No disability, minimal signs on 1 FS
1.5	No disability minimal signs on 2 of 7 FSs
2.0	Minimal disability in 1 of 7 FSs
2.5	Minimal disability in 2 FSs
3.0	Moderate disability in 1 FS; or mild disability in 3 – 4 FSs, , though fully ambulatory.
3.5	Fully ambulatory but with moderate disability in 1 FS and mild disability in 1 or 2 FS; or moderate disability in 2 FS; or mild disability in 5 FSs
4.0	Fully ambulatory without aid, up and about 12hrs a day despite relatively severe disability. Able to walk without aid 500 meters.
4.5	Fully ambulatory without aid, up and about much of day, able to work a full day, may otherwise have some limitations of full activity or require minimal assistance. Relatively severe disability. Able to walk without aid 300 meters.
5.0	Ambulatory without aid for about 200 meters. Disability impairs full daily activities.
5.5	Ambulatory for 100 meters, disability precludes full daily activities
6.0	Intermittent or unilateral constant assistance (cane, crutch or brace) required to walk 100 meters with or without resting.
6.5	Constant bilateral support (cane, crutch or braces) required to walk 20 meters without resting.
7.0	Unable to walk beyond 5 meters even with aid, essentially restricted to wheelchair, wheels self, transfers alone; active in wheelchair about 12 hours a day
7.5	Unable to take more than a few steps, restricted to wheelchair, may need aid to transfer; wheels self, but may require motorized chair for full day's activities
8.0	Essentially restricted to bed, chair, or wheelchair, but may be out of bed much of day; retains self care functions, generally effective use of arms
8.5	Essentially restricted to bed much of day, some effective use of arms, retains some self care functions
9.0	Helpless bed patient, can communicate and eat
9.5	Unable to communicate effectively or eat/swallow
10.0	Death.

2 - EDSS' FUNCTIONAL SYSTEMS

Each Functional System (FS) is graded to the nearest possible grade, and V indicates an unknown abnormality; these are not additive scores and are only used for comparison of individual items.

1. Pyramidal function	<ul style="list-style-type: none"> 0 - Normal 1 - Abnormal signs without disability 2 - Minimal disability 3 - Mild/Moderate paraparesis of hemiparesis; severe monoparesis 4 - Marked paraparesis or hemiparesis; moderate quadraparesis or monoparesis 5 - Paraplegia, hemiplegia, or marked paraparesis 6 - Quadriplegia V - Unknown
2. Cerebellar function	<ul style="list-style-type: none"> 0 - Normal 1 - Abnormal signs without disability 2 - Mild ataxia 3 - Moderate truncal or limb ataxia 4 - Severe ataxia 5 - Unable to perform coordinated movements V - Unknown X - Weakness
3. Brainstem function	<ul style="list-style-type: none"> 0 - Normal 1 - Signs only 2 - Moderate nystagmus or other mild disability 3 - Severe nystagmus, marked extraocular weakness or moderate disability of other cranial nerves 4 - Marked dysarthria or other marked disability 5 - Inability to speak or swallow V - Unknown
4. Sensory function	<ul style="list-style-type: none"> 0 - Normal 1 - Vibration or figure - writing decrease only, in 1 or 2 limbs 2 - Mild decrease in touch or pain or position sense, and/or moderate decrease in vibration in 1 or 2 limb, or vibration in 3 or 4 limbs 3 - Moderate decrease in touch or pain or proprioception, and/or essentially lost vibration in 1 or 2 limbs; or mild decrease in touch or pain and/or moderate decrease in all proprioceptive tests in 3 or 4 limbs 4 - Marked decrease in touch or pain or loss of proprioception, alone or combined in 1 or 2 limbs; or moderate decrease in touch or pain and/or severe proprioceptive decrease in more than two limbs 5 - Loss of sensation in 1 or 2 limbs; or moderate decrease in touch or pain and/or loss of proprioception for most of the body below the head 6 - Sensation essentially lost below the head V - Unknown

5. Bowel and bladder function	0 - Normal 1 - Mild urinary hesitancy, urgency, or retention 2 - Moderate hesitancy , urgency, or retention of bowel or bladder, or rare urinary incontinence 3 - Frequent urinary incontinence 4 - Almost constant catheterization. 5 - Loss of bladder function 6 - Loss of bowel function V - Unknown
6. Visual function	0 - Normal 1 - Scotoma with visual acuity > 20/30 (corrected) 2 - Worse eye with scotoma with maximal acuity 20/30 to 20/59 3 - Worse eye with large scotoma or decrease in fields, acuity 20/60 to 20/99 4 - Marked decrease in fields, acuity 20/100 to 20/200; grade 3 plus maximal acuity of better eye < 20/60 5 - Worse eye acuity < 20/200; grade 4 plus better eye acuity < 20/60 V - Unknown
7. Cerebral function	0 - Normal 1 - Mood alteration 2 - Mild decrease in mentation 3 - Moderate decrease in mentation 4 - Marked decrease in mentation 5 - Dementia V - Unknown

3 – GJENNOMSNITTLIG CELLETALL I CSF HOS MS OG KONTROLLGRUPPEN

	DiagnoseREV	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
csfMonocytes	0	32	25,6490	12,48276	2,20666
	MS	17	7,9533	6,61428	1,60420
csfHactmono	0	32	83,5583	9,76207	1,72571
	MS	17	76,9567	13,34979	3,23780
csfLactmono	0	32	13,2935	7,19973	1,27274
	MS	17	15,5859	6,53682	1,58541
csfBcells	0	28	1,1991	,45379	,08576
	MS	16	1,7179	,84480	,21120
csfTcells	0	32	64,8378	12,59890	2,22719
	MS	17	79,9239	9,33879	2,26499
csfThelper	0	32	45,4834	10,55315	1,86555
	MS	17	71,7712	9,82801	2,38364
csfTcytotox	0	32	24,2483	6,85487	1,21178
	MS	17	20,2256	4,29200	1,04096
csfThelptox	0	32	1,3440	,95098	,16811
	MS	17	,8020	,41324	,10023

4 GJ.SNITTLIG CELLETALL I CSF HOS RR-MS OG KONTROLLGRUPPEN

typeMS	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
csfMonocytes 0	32	25,6490	12,48276	2,20666
RR	13	7,6355	6,80792	1,88818
csfHactmono 0	32	83,5583	9,76207	1,72571
RR	13	77,7467	14,28179	3,96106
csfLactmono 0	32	13,2935	7,19973	1,27274
RR	13	14,9218	7,13031	1,97759
csfBcells 0	28	1,1991	,45379	,08576
RR	12	1,8840	,90143	,26022
csfTcells 0	32	64,8378	12,59890	2,22719
RR	13	79,3807	9,83113	2,72666
csfThelper 0	32	45,4834	10,55315	1,86555
RR	13	70,4566	10,76455	2,98555
csfTcytotox 0	32	24,2483	6,85487	1,21178
RR	13	20,7400	4,66626	1,29419
csfThelptox 0	32	1,3440	,95098	,16811
RR	13	,8380	,44253	,12274

5 – MONOCYTT INDEKS

DiagnoseREV	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
HactLactMonocindex 0	32	8,6367	5,15922	,91203
MS	17	6,2185	3,62713	,87971

6 – GJENNOMSNITTLIG CELLETALL I PB

DiagnoseREV	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
pbMonocytes 0	23	5,5264	1,98347	,41358
MS	8	6,4424	2,26204	,79975
pbHactmono 0	21	6,6711	18,49170	4,03522
MS	8	2,2800	1,33778	,47298
pbLactmono 0	22	11,8208	4,27548	,91154
MS	8	11,4277	6,41217	2,26704
pbNactmono 0	22	79,8664	21,44207	4,57147
MS	8	86,7298	7,31705	2,58697
pbBcells 0	23	4,3109	1,46731	,30596
MS	8	3,2430	,89052	,31485
pbTcells 0	23	25,9354	6,18479	1,28962
MS	8	22,7001	6,23770	2,20536
pbThelper 0	23	61,8527	7,93312	1,65417
MS	8	66,0784	6,24032	2,20629
pbTcytotox 0	23	30,9008	7,56644	1,57771
MS	8	27,5870	5,71630	2,02102
pbThelptox 0	22	,1811	,15763	,03361
MS	7	,1769	,10520	,03976
pbGranulocytes 0	23	56,6444	6,34044	1,32207
MS	8	59,5019	6,81465	2,40934

7 – ANOVA TEST: SAMMENLIGNING EDSS SCORE VS CELLEPOPULASJONER

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
csfMonocytes	Between Groups	237,015	5	47,403	1,040	,463
	Within Groups	319,158	7	45,594		
	Total	556,173	12			
csfHactmono	Between Groups	375,360	5	75,072	,254	,925
	Within Groups	2072,274	7	296,039		
	Total	2447,634	12			
csfLactmono	Between Groups	130,392	5	26,078	,381	,848
	Within Groups	479,704	7	68,529		
	Total	610,096	12			
csfBcells	Between Groups	3,605	4	,901	1,183	,396
	Within Groups	5,333	7	,762		
	Total	8,938	11			
csfTcells	Between Groups	479,697	5	95,939	,987	,487
	Within Groups	680,117	7	97,160		
	Total	1159,813	12			
csfThelper	Between Groups	389,014	5	77,803	,544	,740
	Within Groups	1001,492	7	143,070		
	Total	1390,506	12			
csfTcytotox	Between Groups	100,930	5	20,186	,881	,539
	Within Groups	160,358	7	22,908		
	Total	261,287	12			
csfThelptox	Between Groups	1,757	5	,351	4,145	,045
	Within Groups	,593	7	,085		
	Total	2,350	12			

8 – T TEST: SAMMENLIGNING MS OG KONTROLLGRUPPEN

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Differen ce	Std. Error Differen ce	95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower
csfMono cytes	Equal variances assumed	8,278	,006	5,435	47	,000	17,695 64	3,2555 7	11,14 628	24,2450 0
	Equal variances not assumed			6,486	46,99 4	,000	17,695 64	2,7281 5	12,20 729	23,1839 9
csfHact mono	Equal variances assumed	,950	,335	1,979	47	,054	6,6015 7	3,3356 2	-,1088 4	13,3119 8
	Equal variances not assumed			1,799	25,32 7	,084	6,6015 7	3,6689 8	-,9499 0	14,1530 3
csfLact mono	Equal variances assumed	,074	,787	-1,094	47	,279	2,2924 3	2,0951 9	6,507 42	1,92255
	Equal variances not assumed			-1,128	35,63 0	,267	2,2924 3	2,0330 8	6,417 19	1,83233
csfBcells	Equal variances assumed	12,08 2	,001	-2,660	42	,011	-,51883	,19503	-,9124 1	-,12525
	Equal variances not assumed			-2,276	20,05 1	,034	-,51883	,22795	-,9942 4	-,04342
csfTcells	Equal variances assumed	2,708	,106	-4,336	47	,000	15,086 09	3,4791 6	22,08 526	8,08692
	Equal variances not assumed			-4,749	41,75 3	,000	15,086 09	3,1765 6	21,49 779	8,67440
csfThelp er	Equal variances assumed	2,142	,150	-8,494	47	,000	26,287 73	3,0948 7	32,51 380	20,0616 6
	Equal variances not assumed			-8,685	34,85 5	,000	26,287 73	3,0268 8	32,43 355	20,1419 1
csfTcyto tox	Equal variances assumed	3,288	,076	2,196	47	,033	4,0227 2	1,8320 7	33706	7,70838
	Equal variances not assumed			2,518	45,56 2	,015	4,0227 2	1,5975 0	80628	7,23916
csfThelp tox	Equal variances assumed	4,448	,040	2,232	47	,030	,54200	,24283	05350	1,03050
	Equal variances not assumed			2,769	45,75 4	,008	,54200	,19572	14798	,93602

9 – T-TEST: SAMMENLIGNING RR-MS OG KONTROLLER

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F Lower	Sig. Upper	t Lower	df Upper	Sig. (2- tailed) Lower	Mean Differ- ence Upper	Std. Error Differ- ence Lower	95% Confidence Interval of the Difference	
									Upper	Lower
csfMonocytes	Equal variances assumed	6,993	,011	4,893	43	,000	18,01341	3,68113	10,58970	25,43713
	Equal variances not assumed			6,202	39,001	,000	18,01341	2,90423	12,13906	23,88777
csfHactmono	Equal variances assumed	1,140	,292	1,577	43	,122	5,81157	3,68636	1,62268	13,24582
	Equal variances not assumed			1,345	16,754	,197	5,81157	4,32065	3,31441	14,93755
csfLactmono	Equal variances assumed	,000	,989	-,689	43	,494	1,62831	2,36162	6,39097	3,13434
	Equal variances not assumed			-,692	22,505	,496	1,62831	2,35175	6,49922	3,24259
csfBcells	Equal variances assumed	13,682	,001	3,214	38	,003	-,68489	,21312	1,11633	-,25345
	Equal variances not assumed			2,500	13,454	,026	-,68489	,27399	1,27478	-,09500
csfTcells	Equal variances assumed	1,757	,192	3,718	43	,001	14,54293	3,91107	22,43035	6,65550
	Equal variances not assumed			4,131	28,452	,000	14,54293	3,52067	21,74953	7,33632
csfThelper	Equal variances assumed	1,023	,317	7,155	43	,000	24,97317	3,49044	32,01231	17,93403
	Equal variances not assumed			7,094	21,907	,000	24,97317	3,52048	32,27599	17,67035
csfTcytox	Equal variances assumed	1,875	,178	1,688	43	,099	3,50833	2,07889	-,68414	7,70081
	Equal variances not assumed			1,979	32,573	,056	3,50833	1,77294	-,10055	7,11721
csfThelptox	Equal variances assumed	3,055	,088	1,830	43	,074	,50593	,27647	-,05164	1,06349
	Equal variances not assumed			2,431	42,016	,019	,50593	,20815	08587	,92598

10 – T-TEST: HØYAKTIVERTE MONOCYTTER/TOTALE MONOCYTTER

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F Lower	Sig. Upper	t Lower	df Upper	Sig. (2- tailed) Lower	Mean Difference Upper	Std. Error Difference Lower	95% Confidence Interval of the Difference	
									Upper	Lower
HactMonocindex	Equal variances assumed	50,532	,000	-4,194	47	,000	20,64747	4,92265	30,55057	10,74438
	Equal variances not assumed			-3,043	16,122	,008	20,64747	6,78421	35,02053	6,27441
HactLactMonocindex	Equal variances assumed	3,750	,059	1,716	47	,093	2,41820	1,40882	-,41597	5,25238
	Equal variances not assumed			1,908	43,150	,063	2,41820	1,26716	-,13701	4,97341

11 – T-TEST: CELLEFORDELING PB MS VS KONTROLLER

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F Lower	Sig. Upper	t Lower	df Upper	Sig. (2- tailed) Lower	Mean Difference Upper	Std. Error Difference Lower	95% Confidence Interval of the Difference	
									Upper	Lower
pbMonocytes	Equal variances assumed	,122	,729	-1,086	29	,286	-,91603	,84316	2,64048	-,80842
	Equal variances not assumed			-1,017	10,994	,331	-,91603	,90036	2,89784	1,06578
pbHactmono	Equal variances assumed	1,200	,283	,663	27	,513	4,39111	6,61838	9,18868	17,97091
	Equal variances not assumed			1,081	20,542	,292	4,39111	4,06284	4,06951	12,85174
pbLactmono	Equal variances assumed	4,044	,054	,194	28	,847	,39312	2,02213	3,74902	4,53525
	Equal variances not assumed			,161	9,365	,876	,39312	2,44344	5,10168	5,88791
pbNactmono	Equal variances assumed	,712	,406	-,878	28	,387	6,86338	7,81396	22,86955	9,14278
	Equal variances not assumed			-1,307	27,992	,202	6,86338	5,25268	17,62316	3,89640

pbBcells	Equal variances assumed	1,605	,215	1,926	29	,064	1,0679 0	,55446	-,0661 0	2,20190
	Equal variances not assumed			2,432	20,61 4	,024	1,0679 0	,43902	15387	1,98193
pbTcells	Equal variances assumed	,059	,809	1,272	29	,214	3,2353 8	2,5438 8	- 1,967 43	8,43819
	Equal variances not assumed			1,266	12,15 4	,229	3,2353 8	2,5547 5	- 2,323 14	8,79389
pbThelper	Equal variances assumed	,688	,414	-1,362	29	,184	- 4,2257 3	3,1028 0	- 10,57 166	2,12021
	Equal variances not assumed			-1,532	15,52 1	,146	- 4,2257 3	2,7575 3	- 10,08 612	1,63467
pbTcyto x	Equal variances assumed	,595	,447	1,127	29	,269	3,3137 9	2,9404 3	- 2,700 07	9,32766
	Equal variances not assumed			1,292	16,21 5	,214	3,3137 9	2,5639 2	- 2,115 61	8,74320
pbThelpto x	Equal variances assumed	,555	,463	,065	27	,949	,00417	,06405	-,1272 5	,13559
	Equal variances not assumed			,080	15,39 1	,937	,00417	,05206	-,1065 6	,11489
pbGranul ocytes	Equal variances assumed	,014	,908	-1,078	29	,290	- 2,8575 8	2,6507 9	- 8,279 06	2,56391
	Equal variances not assumed			-1,040	11,51 8	,320	- 2,8575 8	2,7482 4	- 8,873 39	3,15824